

**19 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND**

**DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT**

Offenlegungsschrift
DE 100 37 687 A 1

51 Int. Cl.⁷:
C 12 Q 1/68
 C 12 M 1/34
 G 01 N 33/483
 G 01 N 35/00

21	Aktenzeichen:	100 37 687.8
22	Anmeldetag:	1. 8. 2000
43	Offenlegungstag:	14. 2. 2002

DE 100 37 687 A 1

(71) Anmelder:
TRACE Biotech AG, 38124 Braunschweig, DE

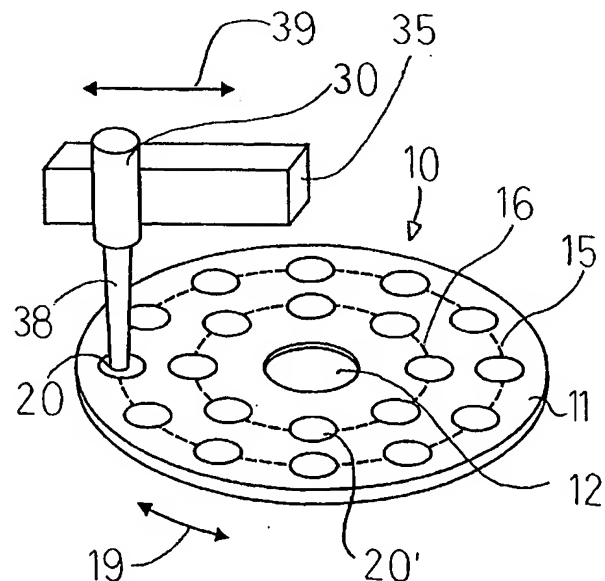
(74) Vertreter:
Eisenführ, Speiser & Partner, 28195 Bremen

⑦2 Erfinder:
Künnecke, Wolfgang, Dr., 38116 Braunschweig, DE

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

- 54) Verfahren zur Herstellung von Oligonucleotid-Arrays und zur Durchführung von Hybridisierungs-Assays sowie Anlagen zur Durchführung dieser Verfahren**

- (57) Beschrieben wird ein Verfahren zur Herstellung eines Oligonucleotid-Arrays auf einer Träger-Disk 10, wobei auf einer Untersuchungsseite 11 Kupplungsorte vorgesehen sind, an denen die Oligonucleotide seriell mit der Disk verknüpft werden. Der Oligonucleotid-Array kann in Hybridisierungs-Assays verwendet werden. Zum Herstellen des Arrays wird die Disk rotiert und/oder werden Lichtquelle und Disk in radialer Richtung relativ zueinander verschoben. Die Auswertung eines Hybridisierungs-Assays erfolgt auf analoge Weise.



DE 100 37 687 A 1

Beschreibung

[0001] Die Erfindung betrifft Verfahren zur Herstellung von Oligonucleotid-Arrays und zur Durchführung von Hybridisierungs-Assays sowie Anlagen zur Durchführung dieser Verfahren.

[0002] Mit dem Fortschreiten der molekulargenetischen Kenntnisse, beispielsweise im Human Genome Project, ist ein rasches Anwachsen der Zahl bekannter DNA-Sequenzen verbunden. Mit den gewonnenen Sequenz-Informationen lassen sich spezifische Nucleinsäuren (DNA, RNA oder chemisch modifizierte Nucleinsäuren) herstellen, mit denen in Hybridisierungs-Verfahren beispielsweise pathogene Bakterien oder das Vorliegen von Mutationen (Gen-Diagnostik) detektiert und gegebenenfalls identifiziert werden können.

[0003] Wegen der hohen Aussagesicherheit solcher Hybridisierungs-Assays werden Anstrengungen unternommen, durch Automatisierung und Miniaturisierung eine möglichst hohe Anzahl von Proben und Sonden in möglichst kurzer Zeit untersuchen zu können.

[0004] Häufig wird dabei auf einem festen Träger eine Nucleinsäure, zumeist die Sonde, immobilisiert oder gleich an Ort und Stelle synthetisiert. Im letzteren Fall wird zunächst ein Startmolekül als Kupplungssubstanz, beispielsweise ein sogenannter Spacer oder Linker wie beispielsweise Bernsteinsäure oder Aminopropyl-Spacer, auf der Träger-Oberfläche fixiert.

[0005] Um an unterschiedlichen Orten auf dem Träger unterschiedliche Nucleinsäuren synthetisieren zu können, ist eine ortsabhängige, gesteuerte Reaktionsführung notwendig.

[0006] Insbesondere hat sich ein Synthese-Verfahren nach Fodor et al., Science 251, 767 (1991) etabliert, bei dem die benötigten Synthese-Bauelemente, nämlich Linker und einzelne Nucleoside, jeweils mit photolabilen Schutzgruppen ausgestattet sind. Beispiele für solche Schutzgruppen werden insbesondere von W. Pfeleiderer in "Biophosphates and Their Analogues - Synthesis, Structure, Metabolism and Activity", Elsevier (Amsterdam) 1987 angegeben.

[0007] Die zunächst auf dem Träger fixierten (geschützten) Linker-Moleküle werden an den Orten, an denen ein Syntheseschritt stattfinden soll, belichtet, wodurch dort die photolabilen Linker-Schutzgruppen entfernt und die Linker entschützt werden. Dann wird eine Lösung hydroxyl-geschützter (Desoxy-)Nucleoside appliziert. Diese werden an den photochemisch entschützten Linkern kovalent gebunden. Die nicht gebundenen Nucleoside werden vom Träger abgewaschen. Anschließend werden die ortsabhängige Belichtung (Entschützung weiterer Linker und/oder bereits angelagerter Nucleosid-Bauelemente) und die Zugabe von (weiteren) Nucleosid-Bauelementen (mit jeweils vorbestimmten Basen) so oft wiederholt, bis an jedem Kupplungsort des Trägers die Synthese abgeschlossen ist. Als Ergebnis liegt dann auf dem Träger ein Nucleinsäure-Array vor. Üblicherweise sind die an den Kupplungsorten erzeugten, fixierten Oligonucleotide zwischen 6 und 30 Basen lang. Im Rahmen dieser Erfindung werden unter dem Begriff "Oligonucleotid" aber auch längere, z. B. 200 Basen lange Nucleinsäuren oder Polynucleotide, beispielsweise ganze Chromosomen, verstanden.

[0008] Moderne Geräte, mit denen das Verfahren nach Fodor et al. durchgeführt wird, verwenden Silizium-Chips, auf denen mit Hilfe von Photolithographie-Belichtungstechniken mehrere Zehntausend unterschiedliche Nucleinsäuren pro Chip synthetisiert werden. Diese Geräte sind jedoch, beispielsweise wegen der Reinheits- und Präzisionsanforderungen der Chip-Technik und der Photolithographie, in An-

schaffung und Betrieb sehr teuer, so daß sie nur für wenige große Firmen in Frage kommen. Außerdem besteht die Gefahr, daß mit einer einzigen Fehlbelichtung, beispielsweise durch eine im Bezug zum Träger-Chip minimal falsch ausgerichtete photolithographische Maske, alle auf dem Chip hergestellten Nucleinsäuren eine falsche Basenfolge besitzen und der gesamte Chip dadurch unbrauchbar ist.

[0009] Es war daher die primäre Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein Verfahren zur Erzeugung eines Oligonucleotid-Arrays anzugeben, das technisch einfach durchzuführen ist und vorzugsweise mit einer üblichen Antriebs-technik und mit üblichen (eventuell leicht modifizierten) Geräten durchgeführt werden kann.

[0010] Dis gestellte Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst durch ein Verfahren zur Erzeugung eines Oligonucleotid-Arrays, mit folgenden Schritten:

a) Bereitstellen

- einer Träger-Disk mit (zumindest) einer Untersuchungssseite, auf der an einer Anzahl von Kupplungsorten photochemisch aktivierbare Kupplungssubstanzen zur jeweiligen Fixierung eines Oligonucleotids oder Oligonucleotid-Bauelements (z. B. ein mit Schutzgruppen versehenes Nucleosid) angeordnet sind und
- einer Lichtquelle zur selektiven photochemischen Aktivierung der Kupplungssubstanzen an einzelnen Kupplungsorten,

b) Verkuppeln der Kupplungssubstanz an einem ersten Kupplungsort mit einem Oligonucleotid oder Oligonucleotid-Bauelement, indem

- das Oligonucleotid bzw. Oligonucleotid-Bauelement auf zumindest den ersten Kupplungsort appliziert,
- die Lichtquelle auf den ersten Kupplungsort gerichtet und
- die Kupplungsverbindung am ersten Kupplungsort durch Beleuchten mit der Lichtquelle aktiviert wird,

c) Rotieren der Disk und/oder Verschieben von Lichtquelle und Disk in radialer Richtung relativ zueinander, um die Lichtquelle auf einen weiteren Kupplungsort zu richten.

[0011] Besonders wichtig ist im Rahmen der vorliegenden Erfindung, daß die Träger-Disk gemäß Schritt c) zwischen zwei Kupplungsorten (Syntheseschritten) rotiert wird. Durch diese Verfahrensführung wird nämlich auf vorteilhafte Weise nicht nur eine technisch einfach zu realisierende Bewegung des Trägers erreicht, sondern zusätzlich auch die Möglichkeit eröffnet, durch Fliehkräfte mechanisch einfach und unmittelbar auf die üblicherweise in flüssiger Darreichungsform (als Lösung oder Suspension) applizierten Oligonucleotide bzw. Oligonucleotid-Bauelemente einzuwirken.

[0012] Beispielsweise können unter der Wirkung von Fliehkräften sehr leicht Flüssigkeitstropfen auf der Träger-Disk-Oberfläche radial verschoben oder ganz vom Träger abgeschleudert werden. Letzteres ist bei den in Synthese- und Hybridisierungsverfahren üblicherweise notwendigen Waschschritten von besonderem Vorteil. Durch das Vorsehen besonderer Oberflächenstrukturen, beispielsweise Kanäle oder durch besonders beschichtete, hydrophile bzw. hydrophobe Bereiche der Trägeroberfläche kann bei einer Rotation die aufgrund der Fliehkraft induzierte Radial-Beschleunigung einer Flüssigkeit auf der Träger-Disk in eine Bewegung auf einer Kreis- oder Spiralbahn um die Rotationsachse umgesetzt werden. Insgesamt führen diese Vor-

teile dazu, daß in dem erfindungsgemäßen Verfahren zumindest weitgehend auf Pipetten oder ähnliche Mittel verzichtet werden kann, mit denen ansonsten Flüssigkeiten von Träger-Oberflächen abgesaugt werden können.

[0013] Bei der im erfindungsgemäßen Verfahren eingesetzten Träger-Disk handelt es sich um eine vorzugsweise flache, im wesentlichen kreisförmige Scheibe. Bei solchen Disks ist es sehr einfach, den Schwerpunkt für eine unwuchtarne Rotationsbewegung zu bestimmen. Im Rahmen dieser Beschreibung gelten dabei solche Disks als flach, bei denen das Verhältnis von Höhe zu Durchmesser des Umfangskreises kleiner oder gleich 1 : 10 ist.

[0014] Vorzugsweise umfaßt die Träger-Disk eine zentral angeordnete Ausnehmung. Dadurch wird es besonders erleichtert, die Disk auf einem Drehteller zur Rotation auszurichten und zu fixieren. Die zentrale Ausnehmung wird häufig kreisförmig sein, kann aber auch eine andere Ausgestaltung haben. Letzteres kann insbesondere dann vorteilhaft sein, wenn eine exakte Ausrichtung der Disk auf dem Drehteller, beispielsweise wegen des Vorhandenseins besonderer Disk-Elemente (wie elektrischer Kontakte) oder zur Verhinderung minimaler Relativ-Verschiebungen von Disk und Drehteller, erwünscht ist. Der Drehteller besitzt dann eine komplementär zur Ausnehmung ausgestaltete Halteeinrichtung zum Eingriff in die Ausnehmung.

[0015] Vorzugsweise entspricht die Träger-Disk in ihrem Außendurchmesser und gegebenenfalls dem Durchmesser der zentralen Ausnehmung einer herkömmlichen Langspielplatte (LP), Compact Disk (CD), DVD oder Minidisk. Bei diesen Abmessungen kann zur Rotation der Disk auf die zum Abspielen herkömmlicher LPs oder CDs entwickelte Antriebstechnik zurückgegriffen werden, was die Fertigung des Rotations-Antriebssystems für die Träger-Disk erleichtert.

[0016] Wie erwähnt, besitzt die im erfindungsgemäßen Verfahren eingesetzte Disk auf einer Untersuchungsseite eine Anzahl von Kupplungsorten, an denen photochemisch aktivierbare Kupplungssubstanzen zur jeweiligen Fixierung eines Oligonucleotids oder Oligonucleotid-Bauelements angeordnet sind (vgl. Verfahrensschritt a). Die Kupplungssubstanzen sind dabei vorzugsweise übliche, photochemisch aktivierbare Linker/Spacer, wie sie beispielsweise auch von Fodor et al. eingesetzt werden. Die Photo-Reaktionsmechanismen dieser Kupplungssubstanzen sowie ihre Herstellung sind dem Fachmann bekannt; er kann aus einer Reihe möglicher Stoffe diejenigen auswählen, die seinen speziellen Bedürfnissen am besten entsprechen. Anstelle üblicher Linker/Spacer können auch mit Schutzgruppen versehene, verlängerbare Nucleoside oder Oligonucleotide auf dem Fachmann bekannte Weise direkt mit dem Trägermaterial verknüpft sein und als Kupplungssubstanz dienen.

[0017] Die Kupplungsorte können auf der Träger-Disk vorbestimmt sein, indem nur bestimmte, räumlich gegeneinander abgegrenzte Bereiche der Untersuchungsseite (Mikrochemotope) mit Kupplungssubstanz beschichtet sind. Dies ist insbesondere dann vorteilhaft, wenn auf der (zumindest einen) Untersuchungsseite besondere Oberflächenstrukturen wie Mikrokanäle oder Reaktions-Ausnehmungen (wells, Kavitäten) vorgesehen sind. Die benötigte Menge an Kupplungssubstanz oder -substanzen zur Herstellung der gemäß Verfahrensschritt a) bereitzustellenden Träger-Disk kann dann sehr gering sein.

[0018] Alternativ kann die Untersuchungsseite auch einen zusammenhängenden Bereich besitzen, der überall mit Kupplungssubstanz beschichtet ist, und von dem Teilbereiche als Kupplungsorte verwendet werden. In diesem Falle werden die Kupplungsorte vorzugsweise nicht bereits bei der Herstellung der Disk genau vorbestimmt, sondern wer-

den erst bei Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens definiert. Da dann bei der Herstellung der Träger-Disk die genaue Lage der Kupplungsorte noch nicht berücksichtigt werden muß, ist die Herstellung solcher Träger besonders einfach.

[0019] Zumindest an den Kupplungsorten (als Basis für die photochemisch aktivierbaren Kupplungssubstanzen) besitzt die Disk vorzugsweise eine Glas- oder Kunststoff-Oberfläche, da an solchen Oberflächen zahlreiche Festphasen-Synthesereaktionen und Hybridisierungsreaktionen besonders einfach durchgeführt werden können. Alternativ kann jedoch auch Silizium die Basis für die Kupplungsorte bilden.

[0020] Gemäß einer bevorzugten Ausgestaltung des erfindungsgemäßen Verfahrens ist zumindest die Kupplungssubstanz am ersten Kupplungsort, vorzugsweise aber auch jede der Kupplungssubstanzen an den weiteren Kupplungsorten, mit einer Schutzgruppe versehen, welche durch Beleuchten mit der Lichtquelle so entfernbar ist, daß eine ungeschützte (aktivierte) Kupplungssubstanz entsteht, die in definierter Weise mit dem Oligonucleotid bzw. Oligonucleotid-Bauelement koppeln kann. Dem Fachmann sind eine Reihe geeigneter Schutzgruppen bekannt, mit denen das erfindungsgemäße Verfahren einfach durchgeführt werden kann.

[0021] Die im erfindungsgemäßen Verfahren eingesetzte Lichtquelle zur selektiven photochemischen Aktivierung der Kupplungssubstanzen ist vorteilhafterweise eine zur photochemischen Aktivierungen der Kupplungssubstanzen (und gegebenenfalls zur Aktivierung auf entsprechende Weise aktivierbarer Oligonucleotide und/oder Oligonucleotid-Bauelemente) eingerichtete Laser-Lichtquelle. Laserlicht hat den Vorteil, daß es nur einen eng begrenzten, auf die betreffende Photoreaktion abgestimmten Wellenlängenbereich umfaßt, gut fokussierbar ist und dabei auf dem Fachmann bekannte Weise preiswert erzeugt werden kann.

[0022] Besonders vorteilhaft ist es, wenn im erfindungsgemäßen Verfahren photoaktivierbare Substanzen (z. B. mit Schutzgruppen versehene Linker, Oligonucleotide oder Oligonucleotid-Bauelemente) verwendet werden, die durch das Licht herkömmlicher, in CD- oder DVD-Lese- und/oder -Schreibgeräten verwendeten Laser-Lichtquellen aktiviert werden können.

[0023] Es kann notwendig sein, bei der Synthese mehr als eine Laser-Lichtquelle zu verwenden, beispielsweise wenn für unterschiedliche Photo-Reaktionen jeweils unterschiedliche Wellenlängen benötigt werden.

[0024] Die Lichtquelle wird erfindungsgemäß nacheinander auf verschiedene Kupplungsorte gerichtet. Die jeweilige Ausrichtung kann dabei beispielsweise über ein Lichtleitsystem mit Spiegeln oder über optisch leitfähige Kabel wie Glasfaserkabel erfolgen. Dies ist insbesondere dann vorteilhaft, wenn eine oder mehrere benötigte Lichtquellen zu sperrig oder zu massiv sind, um selbst sowohl schnell als auch exakt radial gegenüber der Disk verschoben zu werden.

[0025] Vorzugsweise umfaßt die Träger-Disk Bereiche, auf denen digitale Daten in maschinenlesbarer Form gespeichert und/oder ausgelesen werden können. Besonders vorteilhaft ist es, wenn die Träger-Disk so eingerichtet ist, daß gemäß den allgemeinen Prinzipien der CD-Technik mittels einer (Laser-)Lichtquelle (vorzugsweise einer zur Durchführung einer Kupplungsreaktion geeigneten Lichtquelle) ein Beschreiben der Disk mit digitalen Daten und/oder ein Auslesen digitaler Daten von der Disk möglich ist.

[0026] Im erfindungsgemäßen Verfahren wird gemäß Schritt b) an einem ersten Kupplungsort die dort vorliegende Kupplungssubstanz mit einem Oligonucleotid oder Oligonucleotid-Bauelement verkuppelt; in Folgeschritten

können weitere Bauelemente angekuppelt werden. Es gibt eine Reihe von Verfahren zur präparativen Synthese von Nucleinsäuren unter Einsatz von Bauelementen mit photochemischen Schutzgruppen, derer sich der Fachmann auch im Rahmen der vorliegenden Erfindung bedienen kann. Auf das Synthese-Verfahren nach Fodor et al. wurde bereits hingewiesen. Mit fortschreitender Entwicklung der Oligonucleotid-Synthese-Chemie werden dem Fachmann weitere Methoden zur Verfügung gestellt werden, die dann auch (gegebenenfalls in angepaßter Form) im erfindungsgemäßen Verfahren zum Einsatz kommen können.

[0027] Zur Applikation der Oligonucleotide oder Oligonucleotid-Bauelemente – in Schritt b) des erfindungsgemäßen Verfahrens und entsprechenden Folgeschritten – werden vorteilhafterweise Dispensiereinrichtungen wie (Mikro-)Pipetten, die dem Fachmann zur Applikation kleiner Flüssigkeitsmengen bekannt sind, verwendet. Solche Pipetten haben eine hohe Abmeßgenauigkeit.

[0028] Anstelle herkömmlicher Pipetten können ebenso gut Kombinationen aus feinen Düsen und Druckimpuls-Elementen eingesetzt werden, z. B. Piezo-Elemente ähnlich den in Tintenstrahl-Druckerköpfen verwendeten Systemen.

[0029] Diese Systeme bieten insbesondere den Vorteil, daß auch kleinste Flüssigkeitsmengen im Mikro- und Nanoliter-Bereich mit hoher Genauigkeit unter Verwendung einer geringen Zahl beweglicher Bauteile selektiv auf kleine Zielflächen (beispielsweise mit einem Durchmesser von weniger als 1 mm) appliziert werden können.

[0030] Außerdem oder alternativ dazu können die gegebenenfalls auf der Disk-Oberfläche vorgesehenen besonderen Oberflächenstrukturen wie Kanäle, Kavitäten und dergleichen derart als Applizierhilfen ausgestaltet sein, daß bei (ausreichend schneller) Rotation des Trägers durch das Zusammenwirken von Fliehkraft und Oberflächengestaltung Flüssigkeiten von einer Startposition aus gezielt zu einzelnen Kupplungsorten hin befördert werden können. Eine Flüssigkeit mit einem zu applizierenden Oligonucleotid oder Oligonucleotid-Baustein kann dann in einer Startposition in einiger Entfernung vom entsprechenden Kupplungsort auf die Träger-Disk aufgetragen und durch die bei der Disk-Rotation wirkenden Kräfte entlang einer von der Oberflächenstruktur vorgegebenen Bahn zum Kupplungsort transportiert werden.

[0031] Die Synthese-/Kupplungsreaktionen können unter einer transparenten Schicht in einem abgegrenzten Volumen, beispielsweise in einer röhrenförmigen Kanalstruktur oder in einer abgedeckten Kammer, durchgeführt werden. Bei Vorgabe derartiger Strukturelemente kann das spätere Reaktionsvolumen bereits bei der Herstellung der Träger-Disk definiert werden. Die Kupplungs- und Synthesereaktion kann dann mit Zugabe eines Überschusses der beteiligten Lösungen durchgeführt werden, wobei der überschüssige Rest beispielsweise in geeignete, auf der Träger-Disk vorzusehende Auffangkammern abgeführt werden kann. Dementsprechend muß bei einer solchen Begrenzung des Reaktionsvolumens die Abmeßgenauigkeit für die Applikation der beteiligten Lösungen lediglich ausreichend sein, um die Applikation jeweils eines Lösungs-Üerschusses zu sichern; die exakte Dosierung wird dann durch die Strukturelemente der Träger-Disk vorgenommen.

[0032] Zudem verringert eine transparente Abdeckung, beispielsweise aus Glas oder Kunststoff, die Verdunstung von Flüssigkeiten am Kupplungsort.

[0033] Nach dem Verkuppeln am ersten Kupplungsort wird die Lichtquelle gemäß Schritt c) auf einen weiteren Kupplungsort ausgerichtet, indem gegebenenfalls die Disk rotiert bzw. die Lichtquelle radial gegenüber der Träger-Disk verschoben wird. Beide Bewegungen können auch

gleichzeitig stattfinden. Nach der Neuordnung von Lichtquelle und/oder Disk ist die Lichtquelle auf den weiteren Kupplungsort ausgerichtet, an dem dann auf die beschriebene Weise eine weitere photochemische Kupplungs-Synthese-Reaktion durchgeführt werden kann.

[0034] Vorteilhaft ist es, wenn mehr als zwei, vorzugsweise mehr als zehn Kupplungssubstanzen an verschiedenen Kupplungsorten zeitlich nacheinander (seriell) photochemisch aktiviert und mit einem jeweiligen Oligonucleotid oder Oligonucleotid-Bauelement verkuppelt werden, wobei zwischen je zwei photochemischen Aktivierungsschritten an verschiedenen Kupplungsorten die Disk rotiert und/oder Lichtquelle und Disk in radialer Richtung relativ zueinander verschoben werden, um die Lichtquelle auf den jeweils nächsten Kupplungsort zu richten.

[0035] Auf vorteilhafte Weise kann so erreicht werden, daß ein großer Teil der auf dem Träger für Kupplungsreaktionen zur Verfügung stehenden Fläche genutzt wird. So können auf einer Träger-Disk ortsaufgelöst eine Vielzahl von Kupplungs-Synthesen durchgeführt werden.

[0036] Nachdem an allen gewünschten Kupplungsorten die jeweiligen Kupplungsreaktionen durchgeführt wurden, kann die Träger-Disk in schnelle Rotation versetzt werden, um die auf ihr befindlichen Flüssigkeitströpfchen abzuschleudern. Ein Abschleudern kann natürlich ebenso gut nach jedem einzelnen Kupplungsschritt erfolgen. Waschflüssigkeiten können auf den Träger appliziert und gegebenenfalls durch Rotation der Träger-Disk verteilt werden, und auch diese Flüssigkeiten können wiederum durch Rotation abgeschleudert werden.

[0037] Ferner ist ein Verfahren bevorzugt, bei dem eine aktivierte Kupplungssubstanz an einem oder, zeitlich nacheinander, aktivierte Kupplungssubstanzen an mehreren Kupplungsorten mit einem geschützten Nucleosid verkuppelt werden, welches anschließend seinerseits durch Beleuchten mit der Lichtquelle aktiviert werden kann. Durch die photochemische Aktivierung angekuppelter Nucleoside und ihre Umsetzung mit weiteren, lokal zugeordneten Nucleosiden, ist dann auf einfache Weise eine beliebige Verlängerung der Nucleotid-Kette möglich.

[0038] Die Erfindung betrifft auch eine Anlage zur Durchführung der beschriebenen Verfahren zur Herstellung eines Oligonucleotid-Arrays, wobei die Anlage umfaßt:

- eine Träger-Disk mit (zumindest) einer Untersuchungsseite, auf der an einer Anzahl von vorbestimmten Kupplungsorten photochemisch aktivierbare Kupplungssubstanzen zur Fixierung eines Oligonucleotids oder Oligonucleotid-Bauelements angeordnet sind
- eine Lichtquelle zur selektiven photochemischen Aktivierung der Kupplungssubstanzen an einzelnen Kupplungsorten,
- eine Adressiereinrichtung zum Rotieren der Disk und zum Verschieben von Lichtquelle und Disk in radialer Richtung relativ zueinander, um die Lichtquelle auf einen vorgegebenen Kupplungsort auf der Untersuchungsseite der Disk zu richten.

[0039] Die durch verschiedene Gestaltungsmöglichkeiten der Anlage erzielbaren Vorteile wurden zuvor beschrieben.

[0040] Wie eingangs erwähnt betrifft die vorliegende Erfindung nicht ausschließlich ein Verfahren und eine Anlage zur Herstellung eines Oligonucleotid-Arrays, sondern auch ein Verfahren zur Durchführung eines Nybridisierungs-Assays, umfassend:

- a) das Bereitstellen einer auf erfindungsgemäße Weise mit einem Oligonucleotid-Array versehenen Träger-

Disk und

b) die Applikation von Nucleinsäuren (DNA, RNA oder deren Derivate) an zumindest einem Kupplungs-ort auf der Träger-Disk und das Einstellen ausreichend stringenter Hybridisierungsbedingungen.

[0041] Ein solches Verfahren ermöglicht vorteilhaft, eine Vielzahl von Hybridisierungsreaktionen mit einer einzelnen Träger-Disk durchzuführen. Auf diese Weise können beispielsweise verschiedene, an der Träger-Disk gebundene Sonden mit einer Probe einer Nucleinsäure unbekannter Sequenz in Kontakt gebracht werden, um Aufschluß über die Sequenz der beprobten Nucleinsäure zu erhalten. Der Fachmann kann bei der Durchführung des Verfahrens geeignete Hybridisierungsbedingungen wählen, die er gegebenenfalls anhand üblicher Versuchsreihen bestimmen wird.

[0042] In der Regel wird bei der Durchführung des Assays eine optische Auswertung des Hybridisierungs-Resultats vorgenommen. In einer entsprechenden Anlage zur Auswertung eines Hybridisierungs-Assays kann eine Auswerteo-10 ptik vorgesehen sein, die vorzugsweise mit einer Adressier-einrichtung zusammenwirkt, die so eingerichtet ist, daß ein Rotieren der Disk und/oder ein Verschieben von Disk und Auswerteo-10 ptik in radialer Richtung relativ zueinander durchführbar ist, um die Auswerteo-10 ptik zwischen zwei Kupplungs-orten (Auswertepositionen) zu verschieben. Nach der Auswertung an einer ersten Auswerteposition ist also ein Rotieren der Disk und/oder ein Verschieben von Disk und Auswerteo-10 ptik in radialer Richtung relativ zueinander durchführbar, um die Auswerteo-10 ptik auf eine weitere Auswerteposition (einen weiteren Kupplungs-ort) zu richten. Die optische Auswertung des Hybridisierungs-Resultats erfolgt somit auf eine dem Erzeugen des Oligonucleotid-Arrays analoge Weise, indem mittels der Auswerteo-10 ptik eine Detektion an einem ersten Kupplungs-ort vorgenommen wird, anschließend die Disk rotiert und/oder Disk und Auswerteo-10 ptik in radialer Richtung relativ zueinander verschoben werden, um die Auswerteo-10 ptik auf einen weiteren Kupplungs-ort zu richten, und dann an diesem weiteren Kupplungs-ort eine Detektion vorgenommen wird. Vgl. auch die nachfolgende Figurenbeschreibung.

[0043] Der Fachmann wird sich bei der Ausgestaltung der Anlagen zur Durchführung eines Oligonucleotid-Arrays und zur Auswertung eines Hybridisierungs-Assays insbesondere an der Ausgestaltung von Anlagen zum Beschreiben und Auslesen von optischen Datenträgern (CD, Mini-disc, DVD) orientieren. In diesem Bereich der Technik ist in naher Zukunft ein großer Fortschritt zu erwarten, der auch die Ausgestaltung erfindungsgemäßer Anlagen beeinflussen wird.

[0044] Die Erfindung betrifft schließlich auch mehrteilige, ein Adapterelement und ein oder mehrere Substrat-Elemente umfassende Träger-Disks, wobei das Substrat-Element oder die Substrat-Elemente zur Aufnahme eines Arrays biologischer oder chemischer Substanzen ausgerüstet sind oder ein solches Array tragen. Die Träger-Disk kann dabei in einem ihrer Nutzzustände vorliegen, d. h. insbeson-15 dere

– in einem gemäß Schritt a) des erfindungsgemäßen Verfahrens zur Erzeugung eines Oligonucleotid-Arrays bereitgestellten Zustand, d. h. mit bereits angeordneten Kupplungssubstanzen, aber vor der Erzeugung eines Oligonucleotid-Arrays,
– in einem (Roh-)Zustand vor der Anordnung von Kupplungssubstanzen (z. B. Spacer oder Linker), wobei auf der Träger-Disk aber bereits Kupplungs-orte oder -regionen vorgesehen sind, die im Vergleich mit

ihrer jeweiligen unmittelbaren Umgebung besonders gut zur Anbringung einer Kupplungssubstanz geeignet sind,

– im zur Durchführung eines Assays vorbereiteten Zustand, in dem die mehrteilige Träger-Disk mit einem Oligonucleotid-Array oder – für andere Untersuchungsaufgaben – mit einem Protein-Array, insbesondere Peptid-Array, oder mit einem Array anderer biologischer oder chemischer Substanzen (Zellen, Kohlenhydraten etc.), versehen ist oder

– im Zustand nach der Durchführung eines entsprechenden Assays, aber auch in entsprechenden Zwischenzuständen.

[0045] Dementsprechend betrifft die Erfindung auch allgemein ein Verfahren zum Anbringen eines Arrays biologischer oder chemischer Substanzen auf einer Träger-Disk, wobei ein (oder mehrere) Substratelement(e) mit einem Adapterelement (und gegebenenfalls weiteren Bauelementen) zu der Träger-Disk verbunden und zuvor oder anschließend auf dem (den) Substratelement(en) ein Array biologischer oder chemischer Substanzen angeordnet wird. Mit dem Array wird dann der molekularbiologische Assay durchgeführt.

[0046] Eine bevorzugte mehrteilige Träger-Disk umfaßt dabei ein oder mehrere in der Draufsicht rechteckige oder sonstwie gestaltete Substrat-Elemente, wobei diese vorzugsweise von einem Typ sind, wie er bereits bei der Herstellung von Mikroarrays industriell Verwendung findet. Besonders bevorzugt sind solche Ausführungsformen der Erfindung, bei denen das Substrat-Element (a) ein Mikroarray-Chip (insbesondere mit Kunststoff-, Glas- oder Silizium-Grundkörper), eine Membran oder Folie (insbesondere Blotting-Membranen wie Nitrocellulose-, Nylon- oder Polyvinylidenfluorid-(PVDF)-Membranen) oder ein Papierträger (beispielsweise Filterpapier oder beschichtete Papiere) ist oder (b) ein anderes Trägersubstrat zur Aufnahme eines Arrays biologischer oder chemischer Substanzen ist.

[0047] Ein bevorzugtes Beispiel für ein solches Substrat-Element des Typs Mikroarray-Chip sind rechteckige Objektträger aus Glas mit für die Anhaftung von Kupplungssubstanzen vorbereiteter (aktivierter) Oberfläche.

[0048] Das oder die Substrat-Elemente lassen sich (vorzugsweise lösbar) mit dem Adapterelement verbinden, welches im Verbundzustand gemeinsam mit ihm bzw. ihnen die Träger-Disk bildet. Die Art der Verbindung von Adapterelement und Substrat-Element(en) kann dabei, jeweils mit dem Ziel einer guten Handhabbarkeit des Trägerdisk-Ensembles, unterschiedlich sein. Das oder die Substrat-Elemente können formschlüssig, reibschlüssig, kraftschlüssig oder stoffschlüssig mit dem Adapterelement verbunden sein. Beispielsweise kann ein jeweiliges Substrat-Element in eine seiner Form angepaßte durchgehende Öffnung im Adapterelement oder Vertiefung in dessen Oberfläche eingepaßt, eingelegt, eingeklemmt oder eingeklebt sein oder auf die Oberfläche eines scheibenförmigen Adapterelements geklebt oder geklemmt sein.

[0049] Bei Verwendung mehrteiliger Träger-Disks aus (a) Adapterelement und (b) Substrat-Element(en) mit für die Anhaftung von Kupplungssubstanzen vorbereiteter (aktivierter) Oberfläche ist es möglich, mit dem erfindungsgemäßen Verfahren zur Erzeugung eines Oligonucleotid-Arrays z. B. rechteckige Chips (oder andere Substrat-Elemente wie Folien, Papiere etc.) mit einem Mikroarray zu versehen. Sämtliche Kupplungs-orte der Träger-Disk sind dabei vorzugsweise im Bereich des oder der Substrat-Elemente angeordnet. Letztere können dann vom Adapterelement gelöst, einem Assay unterzogen und unter Einsatz handelsüblicher

Substrat-Reader (Biochip-Analysegeräte) untersucht werden. Das Adapterelement einer derartigen mehrteiligen Träger-Disk ist hierbei nach Abtrennung des oder der Substrat-Elemente (z. B. Mikroarray-Chips) vorzugsweise zur neuerlichen Kombination mit frischen (bauartgleichen) Substrat-Elementen geeignet. Gemäß diesem Aspekt der Erfindung läßt sich also die erfindungsgemäße Herstellung eines Oligonucleotid-Arrays (die sich regelmäßig insbesondere durch die Rotation der Träger-Disk auszeichnet) vorteilhaft mit den bereits bekannten Techniken zur Untersuchung nicht-rotationssymmetrischer, insbesondere rechteckiger Mikroarray-Chips kombinieren.

[0050] Wie erwähnt betrifft die Erfindung auch mehrteilige Träger-Disks aus Adapterelement und Substrat-Element(en), wobei das oder die Substrat-Elemente in einem zur Durchführung eines Assays vorbereiteten Zustand vorliegen und mit einem Oligonucleotid-Array oder einem Array anderer biologischer oder chemischer Substanzen versehen sind. Wie im vorstehenden Absatz beschrieben, können die Substrat-Elemente dabei unter Einsatz des erfindungsgemäßen Verfahrens mit einem Oligonucleotid-Array versehen worden sein. Es wird sich bei ihnen aber vorzugsweise um handelsübliche, insbesondere rechteckige Mikroarray-Chips (oder sonstige Substrat-Elemente der oben beschriebenen Typen) handeln, die auf herkömmliche (nicht-erfindungsgemäße) Weise mit einem Oligonucleotid-Array versehen wurden. Solche mehrteiligen, beispielsweise einen oder mehrere Mikroarray-Chips umfassenden Träger-Disks können dann dem erfindungsgemäßen Hybridisierungs-Assay unterzogen werden, bei dem Nucleinsäuren an zumindest einem Kupplungsort (auf dem oder den Chips der Träger-Disk) appliziert und ausreichend stringente Hybridisierungsbedingungen eingestellt werden. Hinsichtlich der Besonderheiten der Durchführung und insbesondere der Auswertung des Hybridisierungs-Assays wird auf die obigen Ausführungen verwiesen. Im Vergleich zwischen (a) der Auswertung von Hybridisierungs-Assays auf handelsüblichen Mikroarray-Chips unter Verwendung üblicher Chip-Reader und (b) der Auswertung von Hybridisierungs-Assays auf Mikroarray-Chips als Bestandteil einer erfindungsgemäßen mehrteiligen Träger-Disk unter Verwendung moderner CD- oder DVD-Lesetechnik liegen die Vorteile eindeutig auf Seiten der mehrteiligen Träger-Disks, denn mit den modernen Lesetechniken aus dem CD- und DVD-Bereich läßt sich eine sehr viel bessere Ortsauflösung erreichen als selbst mit den modernsten Chip-Readern. Gemäß diesem Aspekt der Erfindung werden also auf herkömmliche Weise mit einem Oligonucleotid-Array versehene Mikrochips unter Verwendung der erfindungsgemäßen Lehren bzw. Techniken in Assays eingesetzt und ausgewertet.

[0051] Es ist natürlich auch möglich, ein oder mehrere herkömmliche Mikroarray-Chips (oder andere Substrat-Elemente der genannten Typen) auf übliche (nicht-erfindungsgemäße) Weise in einem Hybridisierungs- oder sonstigen Assay einzusetzen und erst zur Auswertung mit einem Adapterelement zu einer Träger-Disk zu verbinden. Die Auswertung erfolgt dann auf die zuvor beschriebene Weise.

[0052] Nachfolgend werden bevorzugte Ausführungsbeispiele der Erfindung anhand der beigefügten Figuren näher erläutert. Es stellen dar:

[0053] Fig. 1 eine perspektivische schematische Darstellung einer photochemischen Aktivierung in einem erfindungsgemäßen Verfahren,

[0054] Fig. 2a-h eine schematische Darstellung der Synthesevorgänge in einem erfindungsgemäßen Verfahren,

[0055] Fig. 3a-c eine schematische Darstellung einer Hybridisierungs- und Nachweisreaktion an einem Kupplungsort nach Fig. 2a-h,

[0056] Fig. 4a eine Draufsicht auf eine mehrteilige Träger-Disk mit einem Adapterelement und einem rechteckigen Mikroarray-Chip,

[0057] Fig. 4b eine Querschnitt-Ansicht des Adapterelements und des Mikroarray-Chips aus Fig. 4a in nicht verbundener Anordnung.

[0058] In Fig. 1 ist eine Disk 10 dargestellt. Die Disk 10 hat eine im wesentlichen kreisförmige Grundfläche mit einer zentral angeordneten, ebenfalls im wesentlichen kreisförmigen Ausnehmung 12. Die Disk ist flach, wobei ihre Dicke erheblich kleiner (etwa 1 : 30–1 : 120) als ihr Durchmesser ist.

[0059] Auf der Disk-Oberseite (Untersuchungsseite) 11 sind zwanzig Kupplungsorte 20 angeordnet, die jeweils in ihrem Inneren lightsensible (photochemisch aktivierbare) Kupplungssubstanzen umfassen (nicht dargestellt). Die Kupplungsorte 20 definieren zwei voneinander getrennte, konzentrische Ringe 15 und 16 (gestrichelt dargestellt), wobei der äußere Ring 15 zwölf und der innere Ring 16 acht Kupplungsorte umfaßt. Alternativ könnten die Kupplungsorte 20 auch auf andere Weise, beispielsweise auf einer oder mehreren Spiralbahnen, angeordnet sein. Die Zahl der Kupplungsorte 20 ist ebenfalls nicht festgelegt; der Fachmann erkennt, daß bei einer möglichst hohen Zahl von Kupplungsorten 20 die auf der Untersuchungsseite 11 zur Verfügung stehende Fläche besser ausgenutzt werden kann, so daß pro eingesetzter Disk mehr Synthese- und Hybridisierungsreaktionen durchgeführt werden können.

[0060] Die Kupplungsorte 20 sind in der dargestellten Ausführungsform kreisförmig, wobei es auf die genaue Form aber nicht ankommt. Ebenso gut könnten dreieckige, rechteckige oder andere Formen gewählt werden.

[0061] Oberhalb der Disk 10 ist an einem parallel zur Oberfläche der Disk 10 verlaufenden Träger 35 eine Lichtquelle 30 angebracht, die nur schematisch wiedergegeben ist. Die Lichtquelle 30 ist vorzugsweise ein auf die lightsensiblen Kupplungssubstanzen an den Kupplungsorten 20 abgestimmter Laser. In Fig. 1 ist ein von der Lichtquelle 30 ausgehender Lichtkegel 38 dargestellt, der auf einen Kupplungsort 20 eingestellt ist.

[0062] Neben der Lichtquelle 30 können Dispensiereinrichtungen (nicht dargestellt) wie (Mikro-)Pipetten oder dergleichen angeordnet sein, um Oligonucleotide oder Oligonucleotid-Bausteine auf die Kupplungssubstanzen an den Kupplungsorten 20 zu applizieren.

[0063] Die Disk 10 ist auf einem Drehteller (nicht dargestellt) rotierbar angeordnet (vgl. Pfeil 19). Die Lichtquelle 30 kann am Träger 35 entlang in Richtung des Pfeils 39 radial zur Disk 10 bewegt werden. Alternativ könnte die Disk 10 gegenüber der (dann stationären) Lichtquelle 30 radial (in Richtung des Pfeils 39) verschiebbar sein.

[0064] Bei der Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens werden zunächst die Disk 10 und die Lichtquelle 30 bereitgestellt.

[0065] Anschließend wird eine photochemische Kupplungsreaktion am ersten Kupplungsort 20 durchgeführt, wobei zunächst Kupplungsort 20 und Lichtquelle 30 durch Rotation der Disk 10 in Richtung des Pfeils 19 und gegebenenfalls radiales Verschieben der Lichtquelle 30 entlang des Trägers 35 in Richtung des Pfeils 39 aufeinander ausgerichtet werden.

[0066] Der erste Kupplungsort 20 wird hiernach mittels der Lichtquelle 30 belichtet, so daß die zugeordnete Kupplungssubstanz aktiviert wird und die Kupplungsreaktion zwischen Kupplungssubstanz und Oligonucleotid bzw. Oligonucleotid-Bauelement stattfinden kann.

[0067] Am ersten Kupplungsort 20 wird dann das Oligonucleotid oder Oligonucleotid-Bauelement appliziert (nicht

dargestellt).

[0068] Anschließend wird an einem weiteren Kupplungsort 20' eine Kupplungsreaktion durchgeführt. Dieser liegt im dargestellten Beispiel im inneren Ring 16, während Kupplungsort 20 im äußeren Ring 15 angeordnet ist.

[0069] Um den weiteren Kupplungsort 20' anzusteuern, wird die Disk 10 in Richtung des Pfeils 19 um drei Positionen weiter gedreht (rotiert). Zusätzlich wird die Lichtquelle 30 am Träger 35 in Richtung auf die zentrale Ausnehmung 12 bewegt. Beide Bewegungen können gleichzeitig oder in beliebiger Reihenfolge nacheinander ausgeführt werden. Am Ende der Bewegungsvorgänge ist die Lichtquelle 30 auf den Kupplungsort 20' gerichtet, so daß nun an diesem Ort eine Kupplungsreaktion durchgeführt werden kann. Die Vorgehensweise hierbei entspricht der Vorgehensweise am Kupplungsort 20.

[0070] Fig. 2a-d zeigt schematisch die Anlagerung von Nucleosiden an einzelne Kupplungssubstanzen. Es wurde der Übersichtlichkeit halber darauf verzichtet, die Bezugszeichen in den verschiedenen Teilfiguren sowie in Fig. 3a-c zu wiederholen, soweit sie einander entsprechen.

[0071] In Fig. 2a ist schematisch im Querschnitt ein Abschnitt einer Untersuchungsseite 11 einer Disk 10 dargestellt. Kupplungssubstanzen 40, 43, 46 sind an der Untersuchungsseite 11 kovalent gebunden. Jede Kupplungssubstanz 40, 43, 46 ist einem separaten Kupplungsort 41, 44, 47 zugeordnet. Auf die Darstellung von räumlichen Abgrenzungen zwischen den Kupplungsorten wurde der Übersichtlichkeit halber verzichtet.

[0072] Die Kupplungssubstanzen 40, 43, 46 besitzen als Kreise dargestellte lichtempfindliche Schutzgruppen 42, 45, 48 an ihren von der Untersuchungsseite 11 fortweisenden Enden.

[0073] In Fig. 2b ist schematisch ein Belichtungsvorgang eines Kupplungsortes 41 dargestellt. Licht 50 wird auf die lichtempfindliche Gruppe 42 der Kupplungssubstanz 40 eingestrahlt, so daß diese photochemisch aktiviert (entfernt) wird (angedeutet durch Schwärzung). Die übrigen Kupplungssubstanzen 43, 46 bleiben unbelichtet, ihre lichtempfindlichen Gruppen 45, 48 werden nicht aktiviert.

[0074] Nach Applikation eines mit einer lichtempfindlichen Schutzgruppe 62 versehenen Oligonucleotid-Bausteins 60 auf den Kupplungsort 41 wird der Oligonucleotid-Baustein 60 kovalent mit der Kupplungssubstanz 40 verbunden (vgl. Fig. 2c).

[0075] Auf analoge Weise, nämlich durch Belichten der jeweiligen Kupplungssubstanz und Applikation von Oligonucleotid-Bausteinen, werden auch an den übrigen Kupplungsorten 44, 47 Oligonucleotid-Bausteine angeknüpft (vgl. Fig. 2d).

[0076] In den Fig. 2e-h ist schematisch die spezifische Verlängerung einer Nucleotid-Kette an verschiedenen Kupplungsorten dargestellt.

[0077] Fig. 2e zeigt die Belichtung des Kupplungsortes 40 mit Licht 51. Die übrigen Kupplungsorte bleiben unbelichtet. Die Schutzgruppe 62 des Oligonucleotid-Bausteins 60 am Kupplungsort 41 wird durch die Belichtung aktiviert (vgl. Fig. 2f, dargestellt als Schwärzung der Schutzgruppe 62). Nach Zugabe eines mit einer lichtempfindlichen Schutzgruppe 72 versehenen Oligonucleotid-Bausteins 70 am Kupplungsort 41 wird der Oligonucleotid-Baustein 60 kovalent mit dem weiteren Oligonucleotid-Baustein 70 verbunden (vgl. Fig. 2g). In analoger Weise werden die Nucleinsäuren der übrigen Kupplungsorte 44, 47 verlängert, so daß im Ergebnis an allen drei Kupplungsorten 41, 44, 47 Dinucleotide kovalent mit den jeweiligen Kupplungssubstanzen 40, 43, 46 verbunden sind. Die Synthese kann, da jedes endständige Nucleotid eine photosensible Schutzgruppe

trägt, an jedem der Kupplungsorte 41, 44, 47 fortgesetzt werden. Vor der Durchführung von Hybridisierungsreaktionen kann es notwendig sein, die endständigen Schutzgruppen, beispielsweise durch Belichten, zu entfernen.

[0078] In Fig. 3a ist schematisch (als geschlängelte Linie) ein beliebiges mit der Kupplungssubstanz 40 verbundenes Oligonucleotid 100 dargestellt, wie es nach Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens entsprechend den Fig. 2a-h erhalten werden kann.

[0079] In Fig. 3b ist schematisch ein mit dem Oligonucleotid 100 hybridisiertes zweites Oligonucleotid 105 dargestellt. Häufig wird die das Oligonucleotid 105 enthaltende Proben-Lösung weitere Oligonucleotide umfassen, die bei genügend stringenten Hybridisierungsbedingungen nicht stabil mit dem Oligonucleotid 100 hybridisieren können (nicht dargestellt). Die weiteren (nicht hybridisierenden) Oligonucleotide werden häufig, ebenso wie das Oligonucleotid 105, eine photodetektierbare Gruppe 106 umfassen, und müssen daher vor der Detektion ausgewaschen werden, um Fehlmessungen zu vermeiden. Bei der photodetektierbaren Gruppe 106 wird es sich häufig um einen Fluoreszenzfarbstoff handeln, dessen Fluoreszenz auf übliche Weise nachweisbar ist. Des weiteren könnten anstelle von kovalent mit einem Oligonucleotid verknüpften photodetektierbaren Gruppen auch Doppelstrang-erkennende Farbstoffe wie DAPI (4',6-diamino-2-phenylindol) oder Ethidiumbromid als photodetektierbaren Gruppen verwendet werden. Alternativ könnte eine photodetektierbare Gruppe auch ein Biomolekül (Enzym, Antikörper o. dgl.) umfassen, das zusammen mit einem jeweiligen Substrat beispielsweise einen farbigen Niederschlag, ein Fluoreszenz- oder Lumineszenzsignal erzeugt. Bei der Auswahl geeigneter Farbstoffe und photodetektierbarer Gruppen kann sich der Fachmann insbesondere am "Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals", zu beziehen von Molecular Probes Inc., orientieren.

[0080] In Fig. 3c ist schematisch ein Detektionsvorgang dargestellt. Dabei wird Licht 55 auf die photodetektierbare Gruppe 106 eingestrahlt. Von der photodetektierbaren Gruppe 106 wird daraufhin Fluoreszenz-Licht 56 ausgesandt. Dieses hat eine gegenüber dem eingestrahlichten Licht 55 längere Wellenlänge. Das Licht 56 wird optisch aufgefangen und gemessen (nicht dargestellt) und auf übliche Weise zur Auswertung der Hybridisierungsreaktion verwendet. Die Auswerteohtik ist dabei so eingerichtet, daß nach der Auswertung an einer ersten Auswerteposition (Kupplungsorten) ein Rotieren der Disk und/oder ein Verschieben von Disk und Auswerteohtik in radialer Richtung relativ zueinander durchführbar ist, um die Auswerteohtik auf eine weitere Auswerteposition (einen weiteren Kupplungsort) zu richten. Die Auswertung erfolgt dann auf eine dem Erzeugen des Oligonucleotid-Arrays analoge Weise, vgl. Fig. 1.

[0081] In Fig. 4a ist eine erfindungsgemäße mehrteilige Träger-Disk 1 dargestellt, welche einen Mikroarray-Chip 2 sowie ein Adapterelement 3 umfaßt. Der Mikroarray-Chip ist formschlüssig in eine Aussparung (in Fig. 4a nicht separat dargestellt) im Adapterelement eingepaßt und schließt zur Oberfläche des Adapterelements bündig mit diesem ab. In dem Adapterelement 3 ist zudem eine freie Aussparung 4 zur Aufnahme eines weiteren Mikroarray-Chips mit gleichen Abmessungen vorgesehen.

[0082] In Fig. 4b sind das Adapterelement 3 und der Mikroarray-Chip 2 im Querschnitt entlang der Linie A-B aus Fig. 4a dargestellt, wobei der Verbund zwischen diesen beiden Bauteilen jedoch gelöst dargestellt ist. Bei dem Mikroarray-Chip 2 handelt es sich um einen handelsüblichen Glasobjektträger (25 x 76 mm), auf dem in üblicher Weise ein definiertes Mikroarray (Mikroanordnung) von Oligonu-

cleotiden fixiert ist. Der Mikroarray-Chip 2 ist von im wesentlichen rechteckiger Gestalt und läßt sich, wie insbesondere aus Fig. 4b hervorgeht, formschlüssig in jede der zwei entsprechenden Aussparungen 4 des scheibenförmigen Adapterelements 3 einlegen (in Richtung des Pfeiles in Fig. 4b).

[0083] Die Abmessungen der aus Adapterelement 3 und Mikroarray-Chip 2 zusammengesetzten Träger-Disk 1 entsprechen denen einer handelsüblichen CD.

[0084] Das Adapterelement 3 ist außerhalb des Bereichs der Aussparung 4 mit Informationen beschrieben, die auf aus der CD- oder DVD-Technik bekannte Weise ausgelesen werden können. Vgl. beispielsweise L. Boden, Mastering CD-ROM Technology, John Wiley & Sons (1995), ISBN 0-471-12174-6 für einen Überblick über relevante Techniken zum Beschreiben und Auslesen von Informationen im CD-Format.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Erzeugung eines Oligonucleotid-Arrays, umfassend folgende Schritte:

a) Bereitstellen

– einer Träger-Disk (10) mit einer Untersuchungsseite (11), auf der an einer Anzahl von Kupplungsorten (20) photochemisch aktivierbare Kupplungssubstanzen (40, 43, 46) zur jeweiligen Fixierung eines Oligonucleotids oder Oligonucleotid-Bauelements (60) angeordnet sind und

– einer Lichtquelle (30) zur selektiven photochemischen Aktivierung der Kupplungssubstanzen (40, 43, 46) an einzelnen Kupplungsorten (20),

b) Verkuppeln der Kupplungssubstanz (40, 43, 46) an einem ersten Kupplungsort (20) mit einem Oligonucleotid oder Oligonucleotid-Bauelement (60), indem

– das Oligonucleotid bzw. Oligonucleotid-Bauelement (60) auf zumindest den ersten Kupplungsort (20) appliziert,

– die Lichtquelle (30) auf den ersten Kupplungsort (20) gerichtet und

– die Kupplungssubstanz (40, 43, 46) am ersten Kupplungsort (20) durch Beleuchten mit der Lichtquelle (30) aktiviert wird,

c) Rotieren der Disk (10) und/oder Verschieben von Lichtquelle (30) und Disk (10) in radialer Richtung relativ zueinander, um die Lichtquelle (30) auf einen weiteren Kupplungsort (20) zu richten.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß mehr als zwei, vorzugsweise mehr als zehn Kupplungssubstanzen (40, 43, 46) an verschiedenen Kupplungsorten (20) zeitlich nacheinander (seriell) photochemisch aktiviert und mit einem jeweiligen Oligonucleotid oder Oligonucleotid-Bauelement (60) verkuppelt werden, wobei zwischen je zwei photochemischen Aktivierungsschritten an verschiedenen Kupplungsorten (20) die Disk (10) rotiert und/oder Lichtquelle (30) und Disk (10) in radialer Richtung relativ zueinander verschoben werden, um die Lichtquelle (30) auf den jeweils nächsten Kupplungsort (20) zu richten.

3. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß zumindest die Kupplungssubstanz (40, 43, 46) am ersten Kupplungsort (20), vorzugsweise aber auch jede der Kupplungssub-

stanzen (40, 43, 46) an den weiteren Kupplungsorten (20), mit einer Schutzgruppe (42, 45, 48) versehen ist, welche durch Beleuchten mit der Lichtquelle (30) so entferntbar ist, daß eine ungeschützte (aktivierte) Kupplungssubstanz (40, 43, 46) entsteht, die in definierter Weise mit dem Oligonucleotid bzw. Oligonucleotid-Bauelement (60) kuppeln kann.

4. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß eine aktivierte Kupplungssubstanz (40, 43, 46) an einem oder, zeitlich nacheinander, aktivierte Kupplungssubstanzen (40, 43, 46) an mehreren Kupplungsorten (20) mit einem geschützten Nucleosid (60) verkuppelt werden, welches durch Beleuchten mit der Lichtquelle (30) aktiviert werden kann.

5. Anlage zur Durchführung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1–4, umfassend: eine Träger-Disk (10) mit einer Untersuchungsseite (11), auf der an einer Anzahl von vorbestimmten Kupplungsorten (20) photochemisch aktivierbare Kupplungssubstanzen (40, 43, 46) zur Fixierung eines Oligonucleotids oder Oligonucleotid-Bauelements (60) angeordnet sind, eine Lichtquelle (30) zur selektiven photochemischen Aktivierung der Kupplungssubstanzen (40, 43, 46) an einzelnen Kupplungsorten (20), eine Adressiereinrichtung zum Rotieren der Disk (10) und zum Verschieben von Lichtquelle (30) und Disk (10) in radialer Richtung relativ zueinander, um die Lichtquelle (30) auf einen vorgegebenen Kupplungsort (20) auf der Untersuchungsseite (11) der Disk (10) zu richten.

6. Verfahren zur Durchführung eines Hybridisierungs-Assays, umfassend:

a) das Bereitstellen einer gemäß einem der Ansprüche 1–4 mit einem Oligonucleotid-Array versehenen Träger-Disk (10) und

b) die Applikation von Nucleinsäuren (105) an zumindest einem Kupplungsort (20) auf der Träger-Disk (10) und das Einstellen ausreichend stringenter Hybridisierungsbedingungen.

7. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß

c) eine optische Auswertung des Hybridisierungsergebnisses vorgenommen wird, indem mittels einer Auswerteohtik eine Detektion an einem ersten Kupplungsort (20) vorgenommen wird, anschließend die Disk (10) rotiert und/oder Disk (10) und Auswerteohtik in radialer Richtung relativ zueinander verschoben werden, um die Auswerteohtik auf einen weiteren Kupplungsort (20) zu richten, und dann an diesem weiteren Kupplungsort (20) eine Detektion vorgenommen wird.

8. Anlage zur Auswertung eines Hybridisierungs-Assays nach einem der Ansprüche 6 oder 7, umfassend eine Träger-Disk (10) mit einer Untersuchungsseite (11), auf der an einer Anzahl von vorbestimmten Kupplungsorten (20) Oligonucleotide (100) zur Durchführung eines Hybridisierungsassays angeordnet sind, eine Auswerteohtik zur Detektion von Hybridisierungen, und

eine Adressiereinrichtung, die so eingerichtet ist, daß ein Rotieren der Disk (10) und/oder ein Verschieben von Disk (10) und Auswerteohtik in radialer Richtung relativ zueinander durchführbar ist, um die Auswerteohtik zwischen zwei Kupplungsorten (20) zu verschieben.

9. Träger-Disk (1), umfassend ein Adapterelement (3)

und zumindest ein Substrat-Element (2), wobei das Substrat-Element (2) zur Aufnahme eines Arrays biologischer oder chemischer Substanzen ausgerüstet ist oder ein solches Array trägt.

10. Träger-Disk nach Anspruch 9, wobei das Substrat-Element

(a) ein Mikroarray-Chip (2), ein Papierträger oder eine Membran (Folie) ist oder

(b) ein anderes Trägersubstrat zur Aufnahme eines Arrays biologischer oder chemischer Substanzen ist.

11. Träger-Disk nach einem der Ansprüche 9 oder 10, dadurch gekennzeichnet, daß Adapterelement und Substrat-Element lösbar miteinander verbunden sind.

12. Verfahren zum Anbringen eines Arrays biologischer oder chemischer Substanzen auf einer Träger-Disk (1), wobei ein Substrat-Element (2) mit einem Adapterelement (3) zu der Träger-Disk verbunden und zuvor oder anschließend auf dem Substratelement (2) ein Array biologischer oder chemischer Substanzen angeordnet wird.

Hierzu 4 Seite(n) Zeichnungen

25

30

35

40

45

50

55

60

65

- Leerseite -

THIS PAGE BLANK (USPTO)

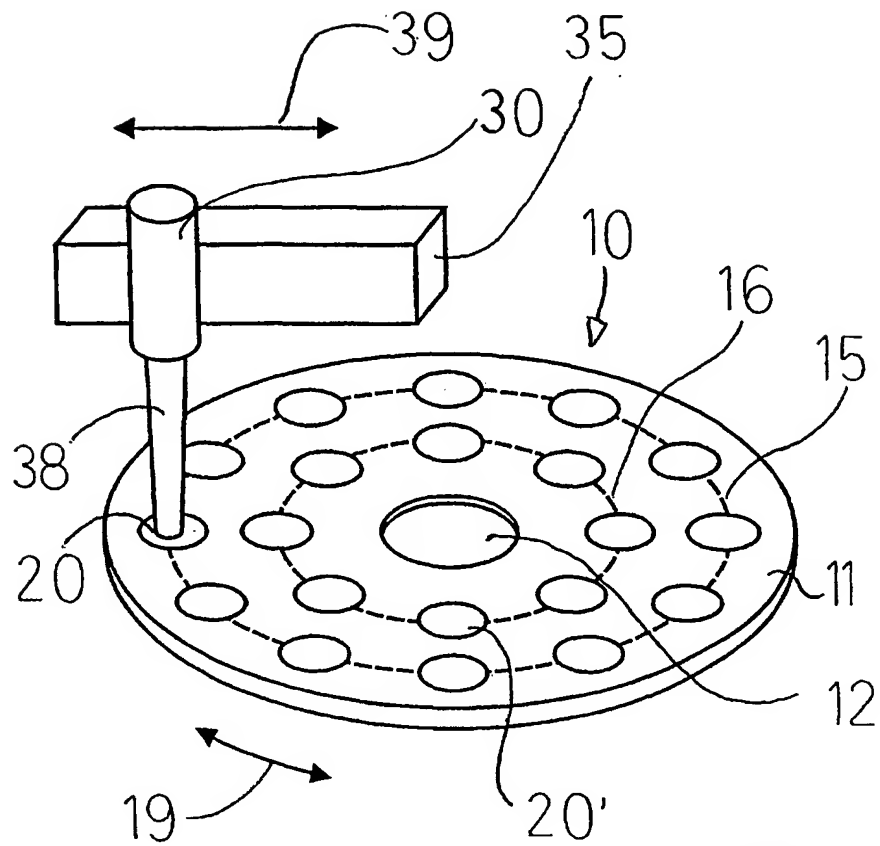
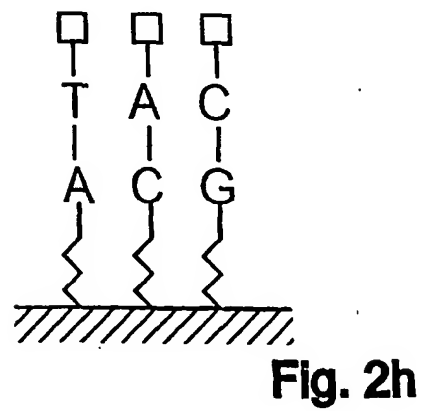
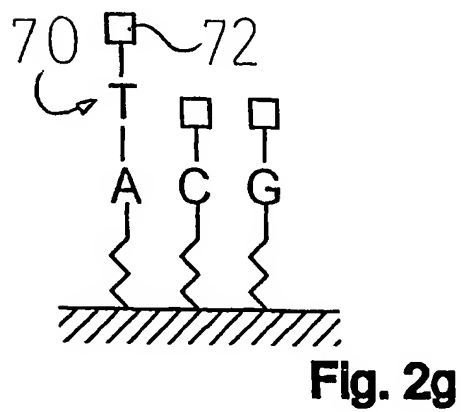
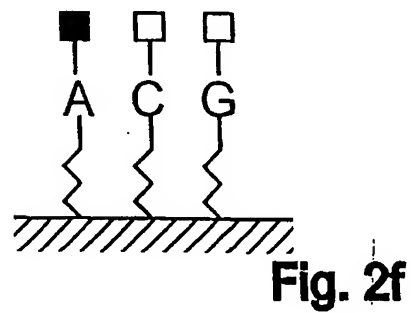
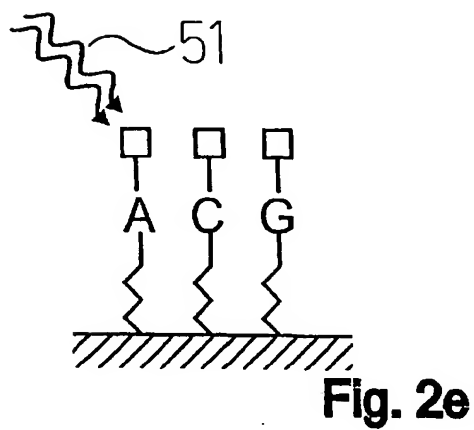
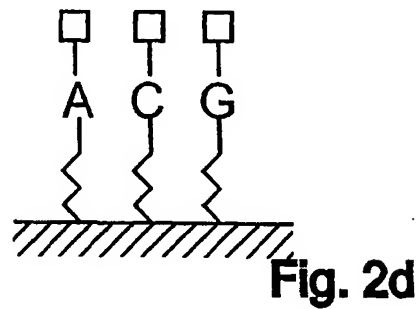
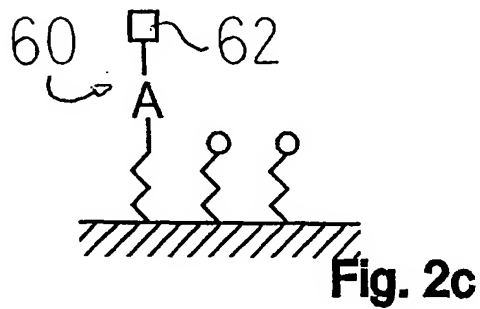
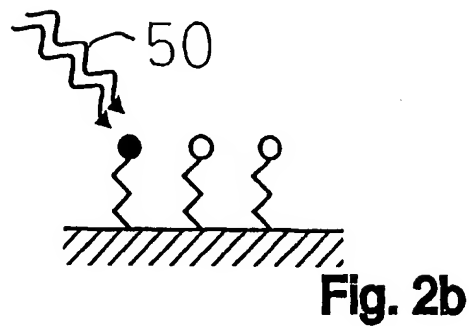
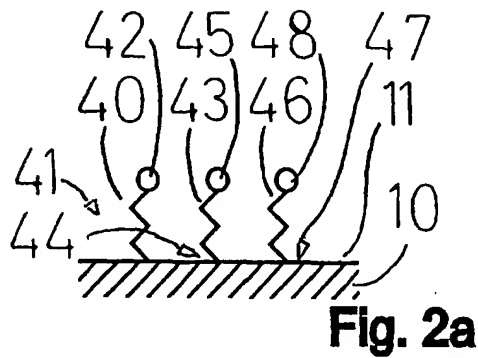


Fig. 1



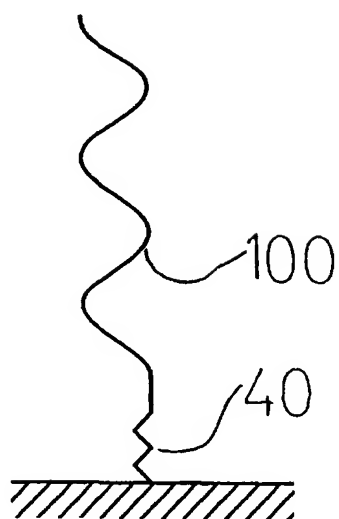


Fig. 3a

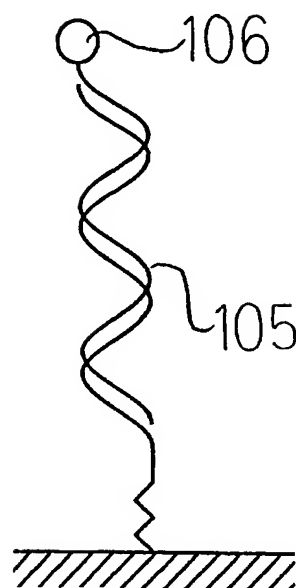


Fig. 3b

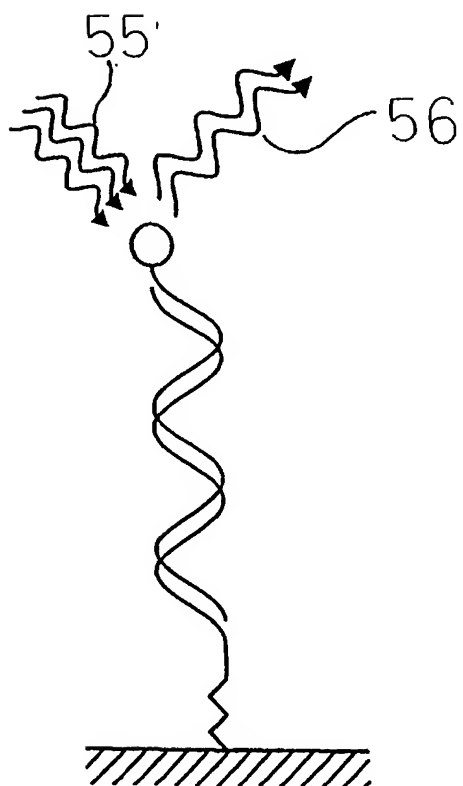


Fig. 3c

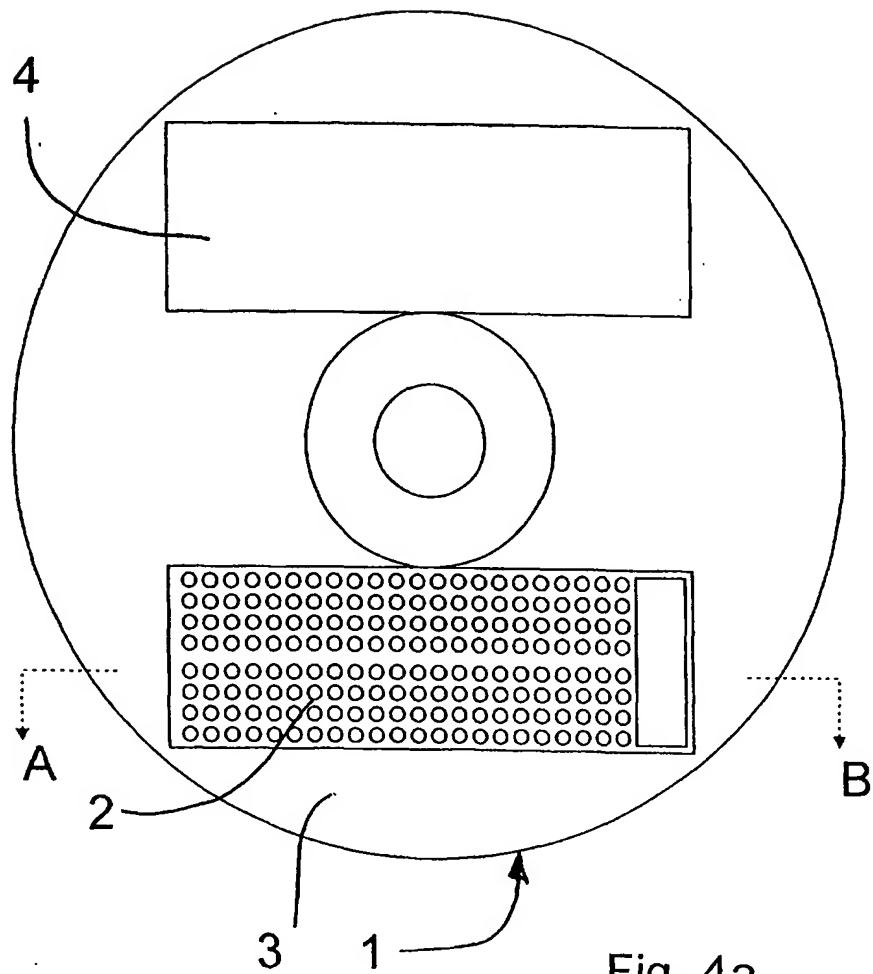


Fig. 4a

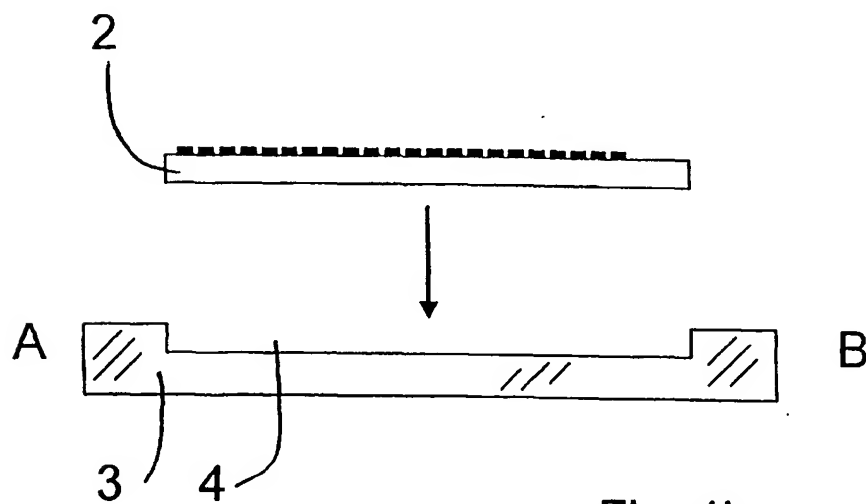


Fig. 4b